PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 5 : C07K 7/10, A61K 39/23 A1

(11) Número de publicación internacional: WO 94/17098

(43) Fecha de publicación internacional: 4 de Agosto de 1994 (04.08.94)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES94/00006

(22) Fecha de la presentación internacional: 21 de Enero de 1994 (21.01.94)

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9300117 23 de Enero de 1993 (23.01.93) ES
P 9400111 20 de Enero de 1994 (20.01.94) ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A. [ES/ES]; Hermanos García Noblejas, 41 2°, E-28037 Madrid (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: CASAL ALVAREZ, José, Ignacio [ES/ES]; Avda. Pablo Iglesias, 90, E-28039 Madrid (ES). VELA OLMO, Carmen [ES/ES]; Antonio Cumella, 29, E-28030 Madrid (ES). LANGEVELD, Joannes, Pieter, Maria [NL/NL]; Beneluxlaan 40, NL-3844 AK Harderwijk (NL). MELOEN, Robert, Hans [NL/NL]; Karveel 1004, NL-8231 AP Lelystad (NL). DALSGAARD, Kristian [DK/DK]; Ny Vordingborgvej 80, DK-4771 Kalvehave (DK).

(74) Representante común: INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.; Att: Carmen Vela Olmo, Hermanos García Noblejas, 41 2°, E-28037 Madrid (ES).

(81) Estados designados: AU, CA, HU, NZ, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.
Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

(54) Title: SYNTHETIC PEPTIDES AND VACCINES AGAINST PARVOVIRUS

(54) Título: PEPTIDOS Y VACUNAS SINTETICOS CONTRA PARVOVIRUS

(57) Abstract

The invention discloses synthetic peptides against autonomous parvovirus, which are capable of inducing neutralizing antibodies against said virus. Said peptides correspond to antigenic sites located in the first 25 aminoacids of the amino terminal extremity of the VP2 proteins of parvovirus. When said peptides couple to carrier proteins or to other immunogenic complexes, they may be used in the formulation of vaccines appropriate to protect animals against the infection caused by said parvovirus.

(57) Resumen

Se describen péptidos sintéticos contra parvovirus autónomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra dichos virus. Estos péptidos corresponden a sitios antigénicos localizados en los 25 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de las proteínas VP2 de Parvovirus. Cuando estos péptidos se acoplan a proteínas portadoras u otros complejos inmunogénicos pueden utilizarse en la formulación de vacunas adecuadas para proteger animales de la infección causada por dichos parvovirus.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Níger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelandia
BJ	Benin	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumania
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CG	Congo			SE	Suecia
CH	Suiza	KR	República de Corea	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazajstán	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TG	Togo
CZ	República Checa	LV	Letonia	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MC	Mónaco	TT	Trinidad y Tabago
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	UA	Ucrania
ES	España	MG	Madagascar	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	ML	Malí	UZ	Uzbekistán
FR	Francia	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
GA	Gabón				

PEPTIDOS Y VACUNAS SINTETICOS CONTRA PARVOVIRUS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a péptidos virales, sintetizados químicamente, relacionados con el antígeno mayoritario (VP2) de la cápsida de los Parvovirus autónomos y a ensayos y a vacunas que utilizan dichos péptidos. A modo de ejemplo, dichos péptidos pueden inducir anticuerpos neutralizantes contra Parvovirus canino (CPV), el virus de la enteritis de los visones (MEV) y el Parvovirus porcino (PPV), por lo que pueden ser formulados en vacunas y conferir protección total en perros, visones y cerdos frente a CPV, MEV y PPV respectivamente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los parvovirus forman una familia viral que posee ciertos rasgos comunes (Cotmore et al., Adv. Virus Res. 33:91-174 (1987)). Son los virus DNA más pequeños que se conocen. Su genoma está formado por una molécula de DNA lineal de unas 5.0 kb de longitud encerrado dentro de una cápsida proteica, de simetría icosaédrica y de unos 25 nm, aproximadamente, de tamaño. En el genoma viral se detectan dos grandes fases de lectura abierta. La fase de la izquierda codifica para las proteínas no estructurales implicadas en la replicación viral, mientras que la fase de la derecha codifica para las proteínas estructurales que forman la cápsida viral, la cual está constituída por las proteínas VP1, VP2 y VP3. El mRNA de ambas fases de lectura es poliadenilado y 3'-coterminal. En la cápsida viral existen 60 copias de VP2 por, aproximadamente, 10 copias de VP1 (Wobble et al., Biochemistry 23, 6565-6569, 1984), que pueden estar dispuestas como homo- y heterodímeros (Paradiso, J. Virol. 46, 94-102, 1983). La VP2 es la proteína que contiene todos los determinantes

antigénicos implicados en la neutralización del virus (López de Turiso et al., J. Gen. Virol., 72, 2445-2456 (1991); Langeveld et al., J. Virol., Vol. 67, No. 2, 765-772 (1993); López de Turiso et al., J. Virol., Vol. 66, No. 5, 2748-2753 (1991)).

Los parvovirus autónomos son los responsables de un elevado número de enfermedades que afectan tanto a los seres humanos como a animales de interés y que pueden llegar a ser fatales debido a la tendencia de los parvovirus autónomos a replicarse en células proliferantes del cerebelo, tejido linfoide, epitelio intestinal o tejidos fetales. Entre estos parvovirus autónomos se encuentran el CPV, el MEV, el PPV, el parvovirus bovino (BPV), el parvovirus de los gansos (GPV), el virus de la panleucopenia felina (FPLV) y el parvovirus B19 que afecta a los seres humanos.

A modo de ejemplo, en esta descripción se particularizará en los parvovirus autónomos CPV y PPV. A continuación se resumen algunas de las principales características de ambos parvovirus.

* Parvovirus canino (CPV)

El CPV es, dentro del género de los parvovirus autónomos, un miembro del subgrupo de los parvovirus felinos. Los otros miembros de este subgrupo, muy similares entre sí, son el virus de la panleucopenia felina (FPLV) y el MEV. El CPV causa enteritis severa en perros de todas las edades y miocarditis en cachorros de menos de 12 semanas de edad. El CPV se aisló por primera vez en 1978 (Burtonboy, G. et al., Arch. Virol. 61:1-11 (1979); Appel et al., Vet. Rec. 105. 156-179 (1979)) y se cree que ha surgido como una variante natural del FPLV o del MEV.

Estudios sobre las secuencias de proteína y de DNA y estudios serológicos muestran una gran homología antigénica y genética entre CPV, FPLV, MEV y el Parvovirus de mapache (Tratschin et al., J. Gen. Virol. 61:33-41

(1982); Carlsson et al., J. Virol., 55, 574-582 (1985); Parrish et al., Arch. Virol. 72, 267-278 (1982); Reed et al., J. Virol. 62:266-276 (1988)). A pesar de esta homología presentan una exquisita especificidad del huésped "in vivo", aunque "in vitro" todos los virus se replican en células de riñón de gato (Appel et al., Vet. Rec. 105, 156-179 (1979); Trastschin, et al., J. Gen. Virol., 61:33-41 (1982)). La cápsida de CPV contiene dos proteínas cuyas secuencias de aminoácidos se solapan ampliamente, VP1 (82-84 KDa) y VP2 (67-70 KDa) (Paradiso et al., J. Gen. Virol. 39, 800-807 (1982); Surleraux et al., Arch. Virol. 82, 233-240 (1984); J. Gen. Virol. 62, 113-125 (1982)). En cápsidas llenas (conteniendo DNA), la VP2 se rompe preferencialmente por digestión proteolítica en VP3 de 63-67 KDa (Paradiso et al., J. Gen. Virol. 39, 800-807 (1982); Surleraux et al. Arch. Virol., 82, 233-240 (1984)), después del ensamblaje de la cápsida (Paradiso, J. Virol. 39, 800-807 (1981)). Actualmente se conoce la estructura tridimensional de la cápsida del CPV (Tsao et al., Science 251: 1456-1464 (1991)).

Nuestro laboratorio ha investigado la inmunogenicidad de diferentes fragmentos de las proteínas que componen la cápsida viral del CPV, y como consecuencia de ello, se han descrito nuevas vacunas de origen recombinante basadas en la proteína VP2 y en fragmentos de VP2 y VP1. Estos hallazgos se resumen en las patentes españolas nº P9002074, relacionada con la expresión de dichos productos en sistemas bacterianos de E.coli; y nº P9100844, relacionada con la expresión de VP2 en un sistema de baculovirus recombinante.

Se han podido identificar 10 sitios antigénicos en la secuencia de la VP2 así como su localización espacial sobre la superficie de la cápsida (J. Langeveld et al., J. Virol. 67.No.2 (1993)).

Se han descrito en CPV cuatro sitios potenciales de

neutralización. Dos de dichos sitios fueron mapeados con péptidos sintéticos, y de ellos, uno se encuentra en el extremo N-terminal y el otro en las posiciones 147-163 de la VP2 (Rimmelzwaan et al., J. Gen. Virol., 71:2741-2745 (1990)). Los otros dos sitios se mapearon sobre y alrededor de un gran dominio protuberante en el eje ternario de simetría de la cápsida viral (Parrish et al., Virology 166:293-307).

El papel del extremo amino terminal de la VP2 en parvovirus es objeto de especulación. Este dominio es importante porque (a) se ha observado neutralización viral "in vitro" cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal específico de ese sitio (López de Turiso et al., J. Gen. Virol. 72:2445-2456 (1991)), (b) es inmunogénico en varias especies animales (Langeveld et al., J. Virol., Vol. 67, No. 2, 765-772 (1993)) y (c) está implicado en la unión del virus a la célula.

Las vacunas peptídicas descritas en esta memoria están dirigidas contra una parte de ese sitio. Gracias al conocimiento de los sitios antigénicos en VP2 se diseñó una colección de péptidos sintéticos de posible interés en la formulación de vacunas. Péptidos sintéticos que incluían aminoácidos del extremo amino terminal de VP2 indujeron consistentemente anticuerpos neutralizantes en animales experimentales. Este dominio constituye, por tanto, un candidato atractivo para su inclusión en una vacuna de péptidos sintéticos.

Actualmente se dispone de vacunas convencionales a base de virus vivo o inactivado y de vacunas recombinantes contra CPV, pero no se dispone de vacunas sintéticas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra CPV y proteger eficazmente a los perros de la infección causada por CPV. Estas vacunas proporcionarían numerosas ventajas no sólo económicas sino además operativas. Las vacunas basadas en péptidos sintéticos son seguras, ya que se eliminan los

riesgos derivados del manejo y difusión de los agentes infecciosos inherentes a las vacunas convencionales, fáciles de producir, muy reproducibles y poseen gran estabilidad. En el caso de CPV, otra gran ventaja de una vacuna sintética es su potencial para evitar los problemas vacunales que se derivan de la inmunidad natural en jóvenes cachorros. Las vacunas convencionales contra CPV no garantizan protección completa en cachorros menores de 10 semanas porque éstos poseen anticuerpos maternales que eliminan la vacuna. Los datos conocidos hasta la fecha indican que entre la población general de anticuerpos anti-virus en animales infectados, los anticuerpos anti-péptido no están presentes en grandes cantidades, si es que hay. Si los anticuerpos inducidos por los péptidos sintéticos no son predominantes "in vivo", la vacuna peptídica permitiría la respuesta inmune en el neonato a una edad más temprana que en las condiciones actuales.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención lo constituyen nuevos péptidos, químicamente sintetizados, que incluyan la totalidad o parte del extremo amino terminal de la VP2 de CPV capaces de inducir anticuerpos y sean neutralizantes contra CPV.

Dada la estrecha homología (superior al 98%) entre CPV, MEV y FPLV, es muy probable que un agente capaz de inducir protección en perros tenga el mismo efecto en otros huéspedes, tales como gatos y visones. Este efecto, será demostrado, a título de ejemplo, en visones. Por consiguiente, estos nuevos péptidos pueden ser utilizados en la obtención de composiciones inmunogénicas y en la formulación de nuevas vacunas sintéticas capaces de proteger perros, y alternativamente, visones y gatos de las infecciones causadas por CPV, MEV y FPLV respectivamente. Dichas composiciones inmunogénicas y vacunas constituyen un objeto adicional de esta invención.

* Parvovirus porcino (PPV)

El PPV causa fallos reproductivos en cerdas, ocasionando muerte y momificación fetal, abortos y otros transtornos reproductivos de las cerdas preñadas (Joo & Johnson, Veterinary Bulletin 46, 653-660 (1976); Mengeling, J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 1291-1294 (1978)). El PPV contiene una molécula de DNA de cadena sencilla de aproximadamente 5000 nucleótidos (Mollitor et al., Virology 137, 241-254 (1984)). La secuencia completa del genoma de PPV ha sido descrita por nuestro grupo (Ranz et al., J. Gen. Virol. 70, 2541-2553 (1989)). Se han descrito 4 proteínas específicas de virus: 3 proteínas que forman la cápsida (VP1, VP2 y VP3 de pesos moleculares 83000, 64000 y 60000 dalton, respectivamente) y una proteína no estructural NS1. De las tres proteínas estructurales, la VP2 de PPV, al igual que la VP2 de CPV, es la proteína que contiene todos los determinantes antigénicos implicados en la neutralización del PPV.

Actualmente existen vacunas que protegen contra la parvovirosis porcina basadas en los métodos tradicionales de inactivación con agentes químicos y/o búsqueda de mutantes atenuados para el virus. Sin embargo, todos los intentos previos de producción de nuevas vacunas utilizando proteínas recombinantes producidas en microorganismos procarióticos (v.g. E.coli) han resultado fallidos.

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha trabajado en la biología molecular del PPV (A. Ranz et al., J. Gen. Virol. 70, 2541-2553 (1989); J.I. Casal et al., Virology, 177, 764-767 (1990)). Estas publicaciones se relacionan con el conocimiento de las secuencias del DNA viral que codifican para la proteínas que forman la cápsida del PPV. Estas secuencias nos permitieron identificar el gen que codificaba para la VP2 del PPV y su manipulación e inserción en vectores adecuados para su expresión en un

sistema de baculovirus, tal como se describe en la patente española nº P9100845, relacionada con la expresión de VP2 de PPV en un sistema de baculovirus recombinante.

Utilizando técnicas similares a las utilizadas con CPV se realizaron pruebas encaminadas a la determinación y búsqueda de sitios antigénicos en PPV. Los resultados obtenidos demostraron que, al igual que en CPV, el extremo amino terminal de la VP2 de PPV es un sitio potencial de neutralización.

Por tanto, aunque actualmente se dispone de vacunas convencionales y recombinantes contra PPV, no se dispone de una vacuna sintética capaz de proteger eficazmente a los cerdos de la infección causada por PPV. Sería conveniente disponer de vacunas sintéticas que incorporaran péptidos de pequeño tamaño capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, lo cual tendría ventajas no sólo económicas sino además operativas.

Por consiguiente, un objeto adicional de esta invención lo constituyen nuevos péptidos sintéticos, procedentes del extremo amino terminal de la VP2 de PPV, capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra PPV que pueden ser utilizados en la obtención de composiciones inmunogénicas y en la formulación de nuevas vacunas sintéticas capaces de proteger cerdos de la infección causada por PPV. Estos péptidos sintéticos están basados en las propiedades inmunogénicas del extremo amino de la proteína mayoritaria VP2 de PPV. Las composiciones inmunogénicas y vacunas que incorporan dichos péptidos constituyen otro objeto adicional de esta invención.

Análogamente, debido a la similitud estructural existente entre los extremos amino terminales de las proteínas VP2 de todos los parvovirus autónomos y a que en todos los animales ensayados en esta invención (conejos, cobayas, perros, visones y cerdos) se han obtenido títulos consistentemente buenos de anticuerpos neutralizantes, se

puede deducir que péptidos sintéticos localizados en posiciones similares, es decir, en el extremo amino terminal de las proteínas VP2 correspondientes, podrían utilizarse también para vacunar humanos contra el Parvovirus B19, bóvidos contra el Parvovirus bovino (BPV), gansos contra el Parvovirus de los gansos (GPV) y, en general, contra cualquier otro Parvovirus autónomo.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: muestra los resultados obtenidos al determinar, mediante un ELISA (Inmunoensayo enzimático) específico de virus, el título de anticuerpos anti-CPV presentes en suero de perros inmunizados con los péptidos de esta invención (perros 3029 —△— y 3030 —○—) y en un perro control (3025 —□—)

Figura 2: muestra los resultados obtenidos al determinar, mediante un ELISA específico de péptido el título de anticuerpos anti-péptidos (1L15 y 7L15) presentes en el suero de perros inmunizados (3029 y 3030) y en el perro control (3025) según la siguiente clave

- —□— : título anti - 1L15 en suero del perro control (3025)
- —△— : título anti - 1L15 en suero del perro inmunizado (3029)
- —○— : título anti - 1L15 en suero del perro inmunizado (3030)
- —■— : título anti - 7L15 en suero del perro control (3025)
- —▲— : título anti - 7L15 en suero del perro inmunizado (3029)
- —●— : título anti - 7L15 en suero del perro inmunizado (3030)

Figura 3 : muestra los resultados obtenidos al determinar

el título de anticuerpos neutralizantes contra CPV en suero de perros control (3025 —□—) e inmunizados con péptidos de esta invención (3029 —△— y 3030 - -○-).

Figura 4 : muestra los resultados obtenidos al determinar la presencia de CPV en heces de perros inmunizados (3029 —△— y 3030 —○—) y en heces de perro control (3025 - -□- -) mediante un ELISA específico de antígeno viral.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona nuevos péptidos útiles para la elaboración de vacunas sintéticas adecuadas para la protección de animales contra infecciones causadas por parvovirus autónomos, tales como CPV, MEV, FPLV y PPV. Las nuevas vacunas contienen, al menos, un péptido sintetizado químicamente, procedente de la región amino terminal de la proteína VP2 de CPV o de la proteína VP2 de PPV. Por región amino terminal, en el sentido utilizado en esta descripción, debe entenderse la región que comprende, al menos, los 25 primeros aminoácidos de la proteína VP2.

1. CPV

Mediante el análisis PEPSCAN (Geysen H.M., et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998-4002 (1984)) se ha podido comprobar que existen 10 sitios antigénicos en la VP2 de CPV (Langeveld et al, citado supra). Otros autores han descrito otros sitios antigénicos (Rimmelzwaan et al., y Parrish et al., (1988) citados supra). En base a todos los sitios descritos se sintetizó una colección de péptidos que cubrían dichos sitios. Al investigar la inmunogenicidad de todos los péptidos sintetizados se comprobó que sólo aquellos péptidos procedentes de los 25 primeros aminoácidos del extremo amino terminal de la VP2 de CPV, conjugados a KLH [Keyhole Limpet Hemocyanine],

eran capaces de inducir antisueros neutralizantes en conejos. Dichos péptidos son capaces de proteger perros de los efectos patógenos de la infección causada por CPV.

Los péptidos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra CPV, proporcionados por esta invención, están contenidos dentro de la Secuencia Identificada nº 1 (SEC. ID. Nº 1) [veáse el apartado relativo al Listado de Secuencias].

Quedan incluídos dentro de esta invención todos aquellos péptidos comprendidos dentro de la SEC. ID. Nº 1 o que resulten de la sustitución de unos aminoácidos de los mostrados en la SEC. ID. Nº 1 por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra CPV. Por razones prácticas se prefieren péptidos sintéticos de una longitud comprendida entre 6 y 20 aminoácidos.

En general, los péptidos de la invención deberán ser, preferentemente, solubles para permitir su acoplamiento a proteínas portadoras adecuadas que potencien su carácter inmunogénico, tal como la proteína KLH o cualquier otra de las habitualmente utilizadas en este campo.

Para la obtención y selección de los péptidos sintéticos de esta invención se siguieron básicamente las siguientes etapas:

a) Síntesis química de los péptidos correspondientes a las regiones más inmunogénicas de la proteína VP2 de CPV.

b) Acoplamiento de dichos péptidos a una proteína portadora.

c) Selección de los péptidos que inducían en conejos una respuesta de anticuerpos capaz de neutralizar al CPV.

d) Inmunización de perros con los péptidos anteriormente seleccionados y realización de una prueba de descarga

con virus virulento para comprobar la protección de los perros frente a la infección.

Estas etapas se describirán posteriormente con más detalle. En una realización particular (Ejemplo 1), se sintetizaron 21 pentadecapéptidos utilizando la química de las Fmoc (Fields C. G. et al., Peptide Res., 4:95-101 (1991)) que consiste, brevemente, en:

(a) preparar una resina (Fase sólida) que incorpora el aminoácido del extremo C-terminal con su extremo amino protegido por un grupo protector adecuado tal como Fmoc (9-fluorofenil-metil-oxi-carbonil) u otro similar (ter-butoxicarbonil, benciloxicarbonil, p-toluensulfonil, trifenilmetilo, u o-nitrofenilsulfenilo);

(b) incorporar sucesivamente y en el orden adecuado los restantes aminoácidos con sus grupos amino debidamente protegidos;

(c) desproteger el péptido sintetizado y separarlo de la resina mediante tratamiento adecuado; y

(d) purificar el péptido químicamente sintetizado.

Los 21 péptidos sintetizados se acoplaron (Ejemplo 3), en donde fue posible, a la proteína portadora KLH y se utilizaron para inmunizar conejos (Ejemplo 4). Efectuada la inmunización se comprobó que los péptidos 1L15, 2L15, 3L15, 4L15, 5L15, 6L15, 7L15, 8L15 y 9L15 eran capaces de inducir anticuerpos que neutralizaban a CPV.

Adicionalmente, se comprobó que perros vacunados con una mezcla de los péptidos 1L15 y 7L15 desarrollaban un alto título de anticuerpos neutralizantes contra el virus y quedaban protegidos frente a la infección posterior con virus virulento (Ejemplo 5). En base a estos resultados se puede afirmar que los péptidos proporcionados por esta invención pueden ser utilizados en la formulación de nuevas vacunas sintéticas al objeto de proteger animales contra la infección causada por CPV. Asimismo, debido a la similitud estructural y a la práctica identidad de las

secuencias de los 25 primeros aminoácidos de los extremos amino terminales de las proteínas VP2 de CPV, MEV y FPLV, se ha podido demostrar que péptidos comprendidos dentro de la SEC. ID. Nº 1 son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra MEV, por lo que pueden ser utilizados en la formulación de vacunas capaces de proteger visones de la infección causada por MEV. Efectivamente, se ha comprobado que visones vacunados con una mezcla de los péptidos 1L15 y 7L15 quedaban protegidos frente a la infección posterior con virus virulento (Ejemplo 6). Esta confirmación experimental con MEV permite suponer que los péptidos incluídos dentro de la SEC. ID. Nº 1 pueden inducir protección en gatos frente al FPLV debido a la homología estructural entre CPV, MEV y FPLV, todos ellos pertenecientes al mismo subgrupo.
Además, dada la homología estructural existente entre todos los parvovirus autónomos se supuso que empleando el mismo procedimiento se podrían encontrar resultados análogos en otros parvovirus, tales como, PPV, BPV o el parvovirus humano B19. A modo de ejemplo se realizó esta demostración en PPV.

2. PPV

Esta invención también proporciona nuevos péptidos útiles para la elaboración de vacunas sintéticas adecuadas para la protección de cerdos contra la infección causada por PPV. Estos péptidos, sintetizados químicamente, proceden de la región amino terminal de la proteína VP2 de PPV.
En primer lugar se investigó la inmunogenicidad de la VP2 de PPV utilizando una estrategia análoga a la seguida en el caso de la VP2 de CPV. Se analizó la secuencia por PEPSCAN y se sintetizó una colección de péptidos situados en las regiones antigénicas identificadas. Estos péptidos, acoplados a KLH, se utilizaron para inmunizar conejos y se pudo comprobar, nuevamente, que sólo aquellos péptidos

comprendidos en la región amino terminal eran capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra PPV y proteger, por tanto, a los cerdos de los efectos patógenos de la infección causada por PPV. Estos péptidos sintéticos están incluídos dentro de la SEC.ID. Nº 2.

Quedan incluídos dentro de esta invención todos aquellos péptidos comprendidos dentro de la SEC. ID. Nº 2 o que resulten de la sustitución de unos aminoácidos de los mostrados en la SEC.ID. Nº 2 por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra PPV. Por razones prácticas se prefieren péptidos sintéticos de una longitud comprendida entre 6 y 20 aminoácidos.

En general, los péptidos de la invención deberán ser, preferentemente, solubles para permitir su acoplamiento a proteínas portadoras adecuadas que potencien su carácter inmunogénico, tal como la proteína KLH.

Para la obtención y selección de los péptidos sintéticos de esta invención se siguieron básicamente las siguientes etapas:

a) Síntesis química de los péptidos correspondientes a las regiones más inmunogénicas de la proteína VP2 de PPV.

b) Acoplamiento de dichos péptidos a una proteína portadora.

c) Selección de los péptidos que inducían en conejos una respuesta de anticuerpos capaz de neutralizar al PPV.

d) Inmunización de cerdos con los péptidos anteriormente seleccionados.

Estas etapas se describirán posteriormente con mayor detalle. En una realización particular (Ejemplo 2), se sintetizaron 17 péptidos en fase sólida utilizando la química de las Fmoc, tal como se ha mencionado previamente

con relación a los péptidos sintéticos de CPV. Los 17 péptidos sintetizados se acoplaron a la proteína portadora KLH (Ejemplo 3) y se utilizaron para inmunizar conejos (Ejemplo 7). Efectuada la inmunización se comprobó que los péptidos denominados 1L15, 5L16, 6L15, 8L15, 10L16 y 13L15 eran capaces de inducir anticuerpos que neutralizaban a PPV (Tabla 5). En base a estos resultados se puede afirmar que dichos péptidos pueden ser utilizados en la formulación de nuevas vacunas sintéticas al objeto de proteger animales contra la infección causada por PPV.

3. Composiciones inmunogénicas y vacunas

A partir de los péptidos proporcionados por esta invención se pueden preparar composiciones inmunogénicas que contienen a dichos péptidos en forma inmunogénica, por lo que pueden utilizarse para formular vacunas capaces de proteger perros, gatos y visones de la infección causada por CPV, FPLV y MEV respectivamente (para lo que se utilizarán péptidos comprendidos dentro de la SEC. ID. Nº 1) y para formular vacunas capaces de proteger cerdos de la infección causada por PPV (para lo que se utilizarán péptidos comprendidos dentro de la SEC. ID. Nº 2). Dichas composiciones inmunogénicas pueden prepararse mediante acoplamiento de, al menos, uno de los péptidos de esta invención a una proteína o estructura multimérica portadora adecuada. En la solicitud de Patente PCT publicada con el nº WO 90/11298 se indican varias referencias relativas a métodos de acoplamiento y proteínas portadoras susceptibles de ser utilizadas. En una realización preferida de esta invención se proporcionan composiciones que comprenden un conjugado inmunogénico de una proteína (KLH) y un péptido de esta invención.

Alternativamente, estas composiciones pueden contener un complejo inmunogénico obtenido por entrecruzamiento del

péptido o una proteína recombinante inmunogénica que contenga uno de los péptidos de esta invención.

Esta invención también proporciona vacunas que se caracterizan porque comprenden una de las composiciones inmunogénicas antes citadas en combinación con, al menos, un adyuvante inmunológico. Dichas vacunas pueden prepararse suspendiendo, al menos, uno de los péptidos de la invención acoplado a una proteína o estructura multimérica portadora adecuada, en un diluyente inmunológicamente aceptable más un adyuvante. Adicionalmente, una vacuna puede contener una mezcla de los péptidos de esta invención como agentes inmunógenos. Como diluyente inmunológicamente aceptable pueden utilizarse soluciones salinas con tampón tris u otras soluciones salinas similares. Como adyuvante pueden utilizarse suspensiones de geles de alúmina solas o combinadas con otros adyuvantes habitualmente utilizados en la formulación de vacunas como QuilA u otros relacionados y de potencia similar.

DESCRIPCION DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION (EJEMPLOS)

Ejemplo 1 SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS DE CPV Y SELECCION DE PEPTIDOS INMUNOGENICOS

Basados en los datos sobre la localización de epítopos B en la cápsida de CPV (Langeveld et al., citado supra), se sintetizaron los 21 péptidos mostrados en la Tabla 1.

TABLA 1[1)]

CODIGO PEPTIDO	SECUENCIA
-10L15	*GQVKRDNLAPMSDGA#
- 5L15	*DNLAPMSDGAVQPDG#
1L15	*MSDGAVQPDGGQPAV#
2L15	*SDGAVQPDGGQPAVR#
3L15	*DGAVQPDGGQPAVRN#
4L15	*GAVQPDGGQPAVRNE#
5L15	*AVQPDGGQPAVRNER#
6L15	*VQPDGGQPAVRNERA#
7L15	*QPDGGQPAVRNERAT#
8L15	*PDGGQPAVRNERATG#
9L15	*DGGQPAVRNERATGS#
11L15	*GQPAVRNERATGSGN#
16L15	*RNERATGSGNGSGGG#
91L15	*AVNGNMALDDIHAQI#
157L17	*NVVLKTVSEDATQPPTK#
172L15	*SLMVALDSNNTMPFT#
283L15	*RALGLPPFLNSLPQS#
296L15	*QSEGATNFGDIGVQQ#
498L15	*LFVKVAPNLTNEYDP#
549L15	*QQMSINVDNQFNYVP#
570L15	*KIVYEKSQLAPRKLY#

1) Tanto en la Tabla 1 como en la Tabla 2:
- cada letra de la secuencia representa un aminoácido designado según el código de nomenclatura de aminoácidos en una sóla letra (Bioquímica Estructural, P. Louisot, Ed. AC, 1ª Edición (1977), págs. 372-373);
- en la parte izquierda de la secuencia se sitúa el extremo amino terminal mientras que el extremo carboxi terminal está situado a la derecha de la secuencia;

- el código del péptido refleja la posición del resto del extremo N-terminal en la secuencia de VP2 (antes de la L) y la longitud (L) del péptido, expresada como número de restos de aminoácidos (detrás de la L);

*: representa un resto de Cisteína con el grupo amino acetilado; y

#: indica que el grupo carboxi del resto del aminoácido terminal está amidado.

Excepto el heptadecapéptido 157L17, la longitud de los péptidos era de 15 residuos de aminoácidos, sin incluir la cisteína N-terminal que se utilizó para el acoplamiento. Dieciséis péptidos fueron lo bastante solubles como para permitir su conjugación a KLH, mientras que otros 5 exhibieron sólo una solubilidad limitada (menor del 10%). La síntesis de estos péptidos se realizó mediante la química de las Fmoc (Saxon Biochemical, Alemania), según el procedimiento general previamente mencionado, sobre resinas Rink^{R} (Saxon). La síntesis se realizó bien manualmente en vasos de vidrio o en un sintetizador Applied Biosystems 430A. Las secuencias están acetiladas en el extremo N-terminal y amidadas en el C-terminal.

Los péptidos se purificaron utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La calidad se analizó en una columna Delta PaK 5 μ C18-100A (0.39 x 15 cm), con un controlador de gradiente modelo 680 y un detector "diode array" modelo 991. Se utilizó un gradiente de acetonitrilo del 0 al 80% (1%/min) en agua y ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% a 30°C y un flujo de 1 ml/min. Antes de acoplarlos a KLH, los péptidos se purificaron sobre una columna C18 Bischoff Prap 2025 de 2 x 25 cm en un equipo HPLC de Hewlett Packard, modelo 1082B y con una lectura a 225 nm. Se utilizaron gradientes de metanol con un incremento de metanol del 1% por min a un flujo de 10 ml/ min en agua y 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético

(TFA). Dependiendo del péptido, las concentraciones iniciales de metanol variaron entre el 0 y el 20%. El análisis de la composición de aminoácidos, se realizó de acuerdo a los procedimientos de Pico-tag (Waters).

Ejemplo 2 **SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS DE PPV Y SELECCION DE PEPTIDOS INMUNOGENICOS**

Basados en los datos sobre la localización de epítopos B en la cápsida de PPV, se sintetizaron los 17 péptidos que se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Código	Secuencia
-7L15	*NTNSNSMSENVEQHN#
1L15	*MSENVEQHNPINAGT#
5L16	*VEQHNPINAGTELSAT#
6L15	*EQHNPINAGTELSAT#
7L15	*QHNPINAGTELSATG#
8L15	*HNPINAGTELSATGN#
10L16	*PINAGTELSATGNESG#
13L15	*AGTELSATGNESGGG#
83L17	IHVLNSESGSAGQMVQD#
225L15	*GQSQQITDSIQTGLH#
293L20	LTEPTTEGDQHPGTLPAANTC#
346L16	YSNGGPFLTPIVPTAD#
364L15	*YNDDEPNGAIRFTMG#
380L19	*QHGHLTTSSQELERYTFNP#
408L19	QQFNQQAPLNLENTNNGTL#
427L18	*LPSDPIGGKSNMHFMNTL#
294L11/87L8	TEPTTEGDQHPNSESGSAG#

Como puede apreciarse, de los 17 péptidos sintetizados, 8 están localizados en la región amino terminal de la VP2 de PPV, mientras que los 9 restantes están localizados en regiones internas de la VP2 de PPV. La longitud de los

péptidos es variable, entre 15 y 20 residuos, sin incluir la cisteína N-terminal que se utiliza para efectuar el acoplamiento. Todos ellos fueron suficientemente solubles para permitir su conjugación a KLH.

La síntesis de estos 17 péptidos se realizó mediante la química de las Fmoc, según el procedimiento general previamente mencionado, sobre resinas Rink® (Ejemplo 1). Las secuencias se obtuvieron de la proteína VP2 de PPV (Ranz et al., citado supra; Sakurai et al., Virus Res. 13, 79-86 (1989)). Las secuencias están acetiladas en el extremo N-terminal y amidadas en el C-terminal. Algunos péptidos se purificaron según el protocolo descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3 CONJUGACION DE LOS PEPTIDOS A KLH

El acoplamiento de los péptidos purificados a la proteína portadora KLH (Calbiochem) se realizó de acuerdo a procedimientos stándard utilizando m-maleimidobenzoil-N-succinimida éster (MBS) como agente de acoplamiento (Lerner et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3403-3407). Los pasos de diálisis se hicieron a 4°C y las otras incubaciones a temperatura ambiente. A cada mg de KLH se le añadió 1 mg de péptido tras la unión de un "linker" a la proteína y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, los conjugados se almacenaron bien directamente (conjugados no dializados) o dializados, con tres cambios de fosfato sódico 0.1M, pH:5.0, durante la noche contra solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los conjugados se dividieron en alícuotas conteniendo 1 mg de KLH y se almacenaron a -20°C. Las relaciones de µg de péptido por mg de KLH oscilaron entre 82 y 304, según el péptido utilizado.

Ejemplo 4 INMUNIZACION DE CONEJOS CON PEPTIDOS DE CPV

Se utilizaron conejos New Zealand White para la

inmunización con péptidos cara a inducir anticuerpos neutralizantes. Los conjugados péptido-KLH (no dializados) correspondientes a 1 mg de péptido en 1 ml de buffer (PBS), se mezclaron con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (FCA) y se inyectaron intramuscular y subcutáneamente en conejos. Tras 65 días los animales recibieron una inmunización de recuerdo con el mismo inmunógeno mezclado con adyuvante incompleto de Freund (FIA). Se hicieron sangrías a los días 0, 57, 64 y 70. Cuando los títulos en el ELISA de péptidos se incrementaron por un factor de al menos 5 tras la inmunización del recuerdo, los animales recibieron un segundo recuerdo con la misma cantidad de conjugado en FIA al día 72 y se sangraron a los días 80 y 102.

4.1 Evaluación del título de anticuerpos anti-CPV en suero de conejos.

4.1.A. <u>ELISA específico de virus</u>

La presencia de anticuerpos específicos para CPV en el suero de los animales inmunizados fue determinada mediante un ensayo de ELISA indirecto. Como antígeno se utilizó virus purificado. Brevemente, placas de poliestireno se recubrieron con 0.5 µg de virus en 100 µl de buffer carbonato (0.05 M, pH 9.6) a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 0.15M en fosfato sódico 0.1 M pH 7.4) conteniendo 0.05% Tween-20 y se incubaron con el antisuero durante 2h a 37°C, se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG de cabra anti-conejo marcado con biotina, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con estreptavidina marcada con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y la reacción se reveló con o-fenilendiamina (OPD) como sustrato para la peroxidasa, durante 10 min en oscuridad y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro multicanal.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, donde puede apreciarse que todos los conejos produjeron anticuerpos contra CPV.

4.1.B ELISA específico de péptidos

Para determinar la presencia de anticuerpos contra los péptidos se utilizó un ensayo de ELISA indirecto. Placas de poliestireno de fondo plano se recubrieron durante la noche con 1 µg de péptido en una solución de carbonato sódico 50 mM pH 9.6 a 4°C. A continuación se añadió el primer anticuerpo, suero de conejo diluído en buffer de incubación que consistía en PBS conteniendo 4% (v/v) de suero de caballo, 1% (v/v) de Tween 80 y NaCl 0.5 M. Tras incubar durante 1h a 25°C, las placas se lavaron con PBS conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 80. A continuación las placas se incubaron con conjugados IgG-peroxidasa anti-conejo diluídos 1/100 en el buffer de incubación, y se lavaron las placas como anteriormente. Por último, la reacción coloreada se formó añadiendo el sustrato tetrametilbenzidina (Aldrich) en acetato sódico 0.1M, pH 5.5 y 0.035% (V/V) de H_2O_2 durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 50 µl de H_2SO_4 1.5M. La absorbancia se midió a 450 nm.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 donde puede observarse que todos los conejos produjeron anticuerpos contra los péptidos utilizados en su inmunización.

4.2. Neutralización de CPV "in vitro"

La neutralización se determinó mediante un experimento de protección de monocapa. Brevemente, una cantidad conocida de CPV (100 unidades de HA) se incubó con antisuero de conejo a diferentes diluciones durante 2 horas a 37°C. A continuación, las muestras se inocularon sobre monocapas de células susceptibles CRFK (ATCC CCL 94) durante 90 min

a 37°C. Las monocapas se cubrieron con 1 ml de agarosa al 1% en medio fresco. A los 5 días post infección se fijaron las células con formaldehído al 10% en PBS durante 20 minutos, se retiró la agarosa y las células remanentes se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol al 50% durante 20 minutos. El nivel de protección se evaluó por "screening" visual de las monocapas infectadas.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 donde puede apreciarse que los péptidos 1L15, 2L15, 3L15, 4L15, 5L15, 6L15, 7L15, 8L15 y 9L15 fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra CPV en conejos.

Los resultados globales de la inmunización de conejos con péptidos de CPV se recogen en la Tabla 3, donde se puede observar que se obtuvieron valores de neutralización comprendidos entre 1/100 y 1/3200. A la vista de estos resultados se puede concluir afirmando que la mayoría de los péptidos localizados entre los péptidos 1L15 y 7L15 inducen una respuesta de anticuerpos neutralizantes incluso más eficaz que la mezcla utilizada en la vacunación de perros. Incluso en términos absolutos, los valores de neutralización obtenidos son superiores a los obtenidos con sueros de perros naturalmente infectados. Este resultado permite concluir afirmando que los 25 restos que componen el extremo amino terminal de la VP2 de CPV constituyen una región altamente inmunogénica y que péptidos comprendidos en ella contienen el potencial antigénico necesario para la preparación de vacunas sintéticas útiles en la prevención de la parvovirosis canina, felina y de visones.

TABLA 3

PEPTIDO	ELISA		TITULO
	REACTIVIDAD ANTI-PEPTIDO	REACTIVIDAD ANTI-VIRUS	DE NEUTRALIZACION
-10L15	++	+	-
- 5L15	++	++	-
1L15	+++	+	1/100
2L15	+++	+++	1/1600
3L15	+++	+++	1/2400
4L15	+++	++	1/200
5L15	+++	+++	1/3200
6L15	+++	+++	1/1600
7L15	+++	+++	1/500
8L15	+++	+++	1/1600
9L15	+++	+++	1/400
11L15	+	+	-
16L15	++**	+	-
91L15	+**	++	-
157L17	++	±	-
172L15	++**	±	-
283L15	++	+++	-
296L15	+**	++	-
498L15	+**	+	-
549L15	±**	++	-
570L15	+	++	-

Explicación de los símbolos

Títulos anti-péptidos: +:<10^3; ++:10^3-10^5; +++:$\geq 10^5$.
ELISA anti-virus: ±<10^2; +:10^2-10^3; ++:10^3-10^4; +++:$\geq 10^4$.
**: Medida por PEPSCAN (en el resto por ELISA anti-péptido) a una dilución de suero de 1/100, ±:<0.300; +:0.3-1.0 y ++:$\geq$1.0

Como se puede observar todos los conejos produjeron

anticuerpos contra los péptidos respectivos que se utilizaron en la inmunización. El resultado más interesante fue el obtenido con los péptidos 1L15, 2L15, 3L15, 4L15, 5L15, 6L15, 7L15, 8L15 y 9L15 que fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, algunos de ellos, los péptidos 2L15, 3L15, 5L15, 6L15 y 8L15 a niveles similares a los obtenidos al usar virus completo como inmunógeno (>1:1600). Cualquiera de estos péptidos, o combinaciones de ellos, puede ser seleccionado para la inducción de anticuerpos neutralizantes en perros y su aplicación como vacuna.

Ejemplo 5 **INMUNIZACION DE PERROS**

Para comprobar el efecto vacunal de los péptidos sobre los huéspedes naturales (perros) se realizó un experimento de inmunización que incluyó infección posterior con el mismo virus. Como animales de experimentación se utilizaron tres perros Beagle SPF (libres de patógenos específicos). Dos de los perros (identificados como 3029 y 3030) se inmunizaron con una mezcla a partes iguales de los péptidos 1L15 y 7L15 conjugados por separado a KLH. La mezcla o "cocktail" de inmunización (2.5 ml de volumen total) contenía 1 mg de cada uno de los péptidos acoplados a KLH adsorbidos sobre geles de alúmina y adyuvantados con QuilA (25 µg/perro). El calendario de vacunación fue como sigue: la primera dosis se dio a día 0, 4 semanas más tarde se les dió una dosis de recuerdo. A las diez semanas se realizó el experimento de descarga de virus virulento, permaneciendo en observación durante 2 semanas más. El perro que se utilizó como control negativo (identificado como 3025) recibió una mezcla buffer (PBS)/adyuvante sin conjugado. Los perros se sangraron los días 0, 15, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 y cada tres días desde la realización de la descarga hasta el fin del experimento.

Para la descarga se utilizaron heces de un perro que había

muerto como consecuencia de una infección por parvovirus y que contenía virus virulento. Las heces se homogeneizaron en medio de cultivo estéril y el virus se extrajo con cloroformo. Este material se aplicó en torundas oronasales sobre los perros en el momento de la infección. La presencia de CPV en estas heces se había comprobado por técnicas de hemaglutinación y de cultivos celulares.

Se evaluó el título de anticuerpos anti-CPV en el suero de los perros mediante:

a) ELISA específico de virus

Se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.1.A anterior pero utilizando antisueros de perros como primer anticuerpo e incubando las placas que contenían dichos antisueros con Proteína A marcada con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se reveló con OPD y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro multicanal. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1 donde puede apreciarse que al cabo de unos 15 días post-1ª vacunación, los sueros de los animales inmunizados (perros 3029 —△— y 3030 —○—) contenían altos títulos de anticuerpos anti-CPV, manteniéndose relativamente constantes tras la 2ª inmunización (4ª semana). Posteriormente, tras el experimento de descarga de virus virulento se produjo un ligero aumento en el título de anticuerpos contra CPV en los perros inmunizados y la muerte del perro control (perro 3025 —□—) al cabo de 6 días.

b) ELISA específico de péptidos

Se repitió el protocolo descrito en el ejemplo 4.1.B pero como primer anticuerpo se añadió suero de los perros a evaluar diluído en el buffer de incubación. Las placas se incubaron posteriormente con conjugados IgG-peroxidasa anti-perro diluídos 1/100 en el buffer de incubación y

finalmente la reacción coloreada se formó añadiendo tetrametilbenzidina, se paró con H_2SO_4 y se midió la absorbancia a 450 nm.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2 donde puede apreciarse que los perros inmunizados (3029 y 3030) produjeron anticuerpos que reconocían los péptidos 1L15 [—△—(3029) y -⊖-(3030)] y 7L15 [—▲—(3029) y -●-(3030)] mientras que el suero del perro control negativo (3025) no contenía anticuerpos que reconocían a los péptidos 1L15 (-□-) ni 7L15 (—■—). Tras la descarga de virus virulento el perro control (3025) murió, mientras que los sueros de los perros inmunizados aumentaron ligeramente su contenido en anticuerpos que reconocían a los péptidos 1L15 y 7L15.

c) Neutralización de CPV "in vitro"

Se siguió el protocolo descrito en el ejemplo 4.2 pero el CPV se incubó con antisuero de los perros (3025, 3029 y 3030) a diferentes diluciones. Tras inocular las muestras sobre monocapas de células CRFK y continuar el protocolo anteriormente citado se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3 donde puede apreciarse que los perros inmunizados (3029 —△— y 3030 —⊖—) produjeron anticuerpos neutralizantes a niveles similares a los obtenidos usando virus completo como inmunógeno (aproximadamente 1:1000). Por el contrario, el perro control (3025 —□—) no produjo en ningún momento anticuerpos neutralizantes.

d) Determinación de CPV en heces de perros

Se determinó la presencia de CPV en heces de perros inmunizados mediante un ensayo de ELISA de doble anticuerpo (ELISA-DAS) según la metodología descrita por Rimmelzwaan et al (Vet. Quart., 1990, 12, 14-20). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4 donde

puede apreciarse que las heces de los perros inmunizados (3029 —△— y 3030 --○--) no contenían prácticamente CPV mientras que, por el contrario, las heces del perro control (3025 —□—) contenían altos niveles de CPV después de la descarga de virus virulento.

e) Evaluación clínica

Junto a los datos serológicos previamente descritos se realizó un seguimiento clínico del curso de la enfermedad, registrándose diariamente la temperatura y signos externos. Asimismo, las heces de los animales se recolectaron diariamente. Clínicamente, se observó que los animales inmunizados con los péptidos 1L15 y 7L15 (perros 3029 y 3030) no mostraron en ningún momento síntomas aparentes de la enfermedad, mientras que el perro control (3025) moría a los 6 días, mostrando todos los síntomas característicos de una parvovirosis (diarrea, sangre en las deposiciones y presencia de CPV). Los dos perros inmunizados desarrollaron altos títulos de anticuerpos anti-péptido y anti-CPV, incluyendo una alta actividad neutralizante que alcanzó un máximo a la semana 5 (Fig. 3), siguiente a la 1ª inmunización. La dosis de recuerdo no reforzó el título de anticuerpos. El perro control permaneció negativo durante el periodo de vacunación. Después de la descarga oronasal con CPV, los dos perros vacunados permanecieron sanos durante el periodo completo.

Ejemplo 6 **INMUNIZACION DE VISONES**

Debido a la estrecha homología entre CPV, FPLV y MEV, se realizó este experimento de inmunización de visones al objeto de comprobar experimentalmente la eficacia de estos nuevos péptidos en el diseño de vacunas contra MEV.

6.a Inmunización

Se utilizaron tres grupos de visones (genotipo A/A),

seronegativos para el virus de la enfermedad de las Aleutianas y el virus de la enteritis de los visones (MEV). El grupo 1 (nºs 1-6) fueron vacunados con 0.5 mg del péptido 1L15 acoplado a 0.5 mg de KLH más 0.5 mg del péptido 7L15 acoplado a 0.5 mg de KLH, utilizándose como adyuvante 50 µg de ISCOM matrix, todo ello en un volumen final de 1 ml de PBS (pH: 7.2). El grupo 2 (nºs 7-12) sólo recibió 1 ml de PBS (pH: 7.2). El grupo 3 (nºs 13-18) recibió una vacuna convencional (BIOVAC®, United, DK) basada en virus inactivado, que se administró siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todos los visones recibieron una única dosis vacunal subcutánea y fueron sangrados inmediatamente antes de la vacunación.

6.b Descarga (challenge)

A los 21 días de la vacunación se tomaron muestras de sangre y se dejó a los visones en ayunas durante 24 h. A continuación se infectaron por ruta oronasal utilizando 0.8 ml de un homogeneizado intestinal de visones que sufrían infección aguda por MEV, al 25%. Diariamente se chequearon muestras fecales de todos los visones para la detección de MEV, utilizando un ELISA basado en antisueros específicos de conejos. Los animales del grupo 2 (controles negativos) secretaron cantidades masivas de virus a los días 5, 6 y 7 después de la descarga. Todos ellos fueron sacrificados indoloramente en estado moribundo a causa de una severa enfermedad.

Los otros dos grupos de visones no secretaron virus en las heces. Tan sólo un visón del grupo 1 mostró una pequeña indicación de virus el día 6, aunque todos los animales fueron clínicamente normales, libres de diarrea y mantuvieron buen apetito a lo largo del experimento.

El virus secretado por el grupo control fue extraído de las muestras fecales positivas y sometido a microscopía inmunoelectrónica, confirmándose la presencia de un gran

número de partículas de MEV.

6.c Determinación de anticuerpos neutralizantes

Todos los sueros de los visones se chequearon para su actividad neutralizante contra MEV cultivado en células CRFK. El virus no neutralizado fue detectado mediante la técnica de la inmunoperoxidasa utilizando placas microtiter conteniendo células CRFK infectadas con 100 $DICT_{50}$ (dosis infectiva en cultivo de tejido 50%) de MEV, infectadas durante 4 días y fijadas (M. Holm-Jensen, Acta Vet. Scand., 22:85-98 (1981)). Posteriormente se incuba a 37°C durante 1 h con un anticuerpo ligado a peroxidasa y se revela. Los títulos obtenidos se muestran en la Tabla 4. El título del punto final se expresó como la inversa de la dilución de suero más alta que neutralizaba la infección del virus en la monocapa de células.

A los 21 días posteriores a la vacunación, los grupos que habían recibido la vacuna comercial mostraban buenos títulos de neutralización (> 3log10). Los animales control y el grupo vacunado con la vacuna peptídica no mostraron anticuerpos neutralizantes en el ensayo "in vitro", lo que indica que se puede conseguir una protección completa contra la enfermedad, inducida por un péptido sintético, sin la inducción de anticuerpos neutralizantes "in vitro". Se puede especular con que la protección puede ser debida bien a la inhibición de un sitio de unión celular por los anticuerpos al péptido o a la inducción de un mecanismo mediado por células.

Dos semanas después de la descarga todos los visones presentaban anticuerpos neutralizantes frente a MEV. En conclusión, se puede afirmar que con una vacuna sintética basada en los péptidos de esta invención se puede obtener una sólida protección de visones y, por tanto, pueden ser también formulados en la preparación de una vacuna efectiva.

TABLA 4

Visón	Título (log10) [21 días post-vacunación]	Título (log10) [14 días post-descarga]
1	<1.0	2.7
2	<1.0	3.1
3	<1.0	3.0
4	<1.0	>3.1
5	<1.0	>3.1
6	<1.0	3.1
7	<1.0	3.1
8	<1.0	>3.1
9	<1.0	>3.1
10	<1.0	>3.1
11	<1.0	>3.1
12	<1.0	3.0
13	>3.1	>3.1
14	>3.1	>3.1
15	>3.1	>3.1
16	>3.1	>3.1
17	>3.1	>3.1
18	>3.1	>3.1

Ejemplo 7 **INMUNIZACION DE CONEJOS CON PEPTIDOS DE PPV**

Se utilizaron conejos New Zealand White para la inmunización con péptidos cara a inducir anticuerpos neutralizantes. Los conjugados péptido-KLH correspondientes a 1 mg de péptido en 1 ml de buffer (PBS), se mezclaron con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (FCA) y se inyectaron intramuscular y subcutáneamente en conejos. Tras 42 días los animales recibieron una inmunización de recuerdo con el mismo inmunógeno mezclado con adyuvante incompleto de Freund (FIA). Se hicieron sangrías a los días 0, 39, 50 y 71.

7.1 **Western Blot (inmunoblot)**

Para determinar la especificidad de los anticuerpos inducidos por los péptidos en los conejos se utilizó un ensayo de Western Blot. Para ello, PPV completo purificado se corrió en un gel del 10% de poliacrilamida-SDS (dodecilsulfato sódico) en las condiciones habituales (Laemli, U.K., Nature 227:680-685 (1970). A continuación, las proteínas se transfirieron a filtros de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Millipore, EEUU), utilizando un aparato semiseco (KEM-En-Tec, DK) y la inmunotinción se llevó a cabo según técnicas establecidas (Burnette, W.N., Anal. Biochem., 112:195-203 (1981); De Blas D.L. et al., Anal. Biochem., 133:214-219 (1983). Brevemente, los filtros se bloquearon en una solución conteniendo 10% de suero fetal de ternera y 1% de seroalbúmina bovina (BSA) durante 30 minutos. A continuación se añadió suero de conejo anti-PPV, diluído 1:100, durante 2 h a temperatura ambiente y durante la noche a 5°C. Posteriormente se lava tres veces y, por último, se incuba durante 2 h con anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa (Dako P217, DK) diluída 1:500. Como cromógeno se utilizó o-dianisidina. Los resultados indicando la reactividad con las proteínas estructurales se muestran en la Tabla 5.

7.2 **Neutralización de PPV "in vitro"**

Diluciones dobles seriadas de cada suero, inactivados a 56°C durante 30 min, se prepararon en medio esencial mínimo de Eagle (Eagle´s MEM). Posteriormente, 50 µl de cada dilución se mezcló con 100-300 $DICT_{50}$ de la cepa danesa 893 de PPV (SVIV, Lindholm) en 50 µl de medio Eagle y se dejó incubar durante 60 min a 37°C. A continuación, cada dilución se mezcló, en una placa de 96 pocillos, con 2000 células primarias de riñón de cerdo en 50 ml de medio Eagle´s MEM y suero fetal de ternera hasta una concentración final del 7% y se dejó incubar durante 4-5

días a 37°C.

Las placas se tiñeron utilizando un ensayo de inmuno peroxidasa en monocapa, utilizando un suero anti-PPV porcino, inmuno globulina de conejo anti cerdo unida a peroxidasa y tinción con amino-etil-carbazol, siguiendo protocolos convencionales (Holm-Jensen citado supra). El título del punto final se expresó como la inversa de la dilución de suero más alta que neutralizaba la infección del virus en la monocapa de células.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 donde puede apreciarse que los péptidos 1L15, 5L16, 6L15, 8L15, 10L16 y 13L15 fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra PPV en conejos.

TABLA 5

ANTISUEROS CONTRA EL PEPTIDO	WESTERN BLOT	NEUTRALIZACION
-7L15	-	-
1L15	VP1,VP2	+
5L16	VP1,VP2	+
6L15	VP1,VP2	+
7L15	-	-
8L15	VP1,VP2	+
10L16	VP1,VP2	+
13L15	VP1,VP2,VP3	+
83L17	VP1,VP2,VP3	-
225L15	VP1,VP2,VP3	-
293L20	VP1,VP2,VP3	-
346L16	VP1,VP2,VP3	-
364L15	VP2,VP3	-
380L19	VP1,VP2,VP3	-
408L19	VP1,VP2,VP3	-
427L18	VP1,VP2,VP3	-
294L11/87L8	VP1,VP2,VP3	-

Explicación de los símbolos:
NEUTRALIZACION: -:<2; + : 2-20.

Como se puede observar, todos los conejos produjeron anticuerpos contra las proteínas de la cápsida de PPV, como se pudo determinar por Western Blot. El resultado más interesante fue el obtenido con los péptidos 1L15, 5L16, 6L15, 8L15, 10L16 y 13L15 que fueron capaces de inducir anticuerpos capaces de neutralizar PPV "in vitro". Estos péptidos fueron seleccionados para la inducción de anticuerpos neutralizantes en cerdos y su aplicación como vacuna.

Ejemplo 8 **INMUNIZACION DE CERDOS**

Para comprobar la inmunogenicidad de los péptidos sobre el animal huésped se utilizó como ejemplo el péptido denominado 5L16 (Tabla 2).
Tres cerdos "mini pig" Göttingen, seronegativos para PPV, fueron vacunados, cada uno, con 1 mg de péptido 5L16 acoplado a a 1 mg de KLH. Como adyuvante se utilizó ISCOM Matrix (500 µg) y la muestra se llevó hasta 2 ml con PBS. Los cerdos fueron vacunados dos veces con tres semanas de intervalo. Las muestras de suero se obtuvieron a los días 0, 25 y 36.

8.a Ensayo ELISA contra PPV

Se adsorbieron viriones de PPV a placas de poliestireno de fondo plano (Nunc). A continuación se añadieron a las placas diluciones seriadas (factor 2) de los sueros de cerdo y se incubaron a 37°C durante 1 h. Las placas se lavaron y se añadió suero de conejo anti-IgG de cerdo conjugada a peroxidasa. Posteriormente se incubó durante 30 min a 37°C y se tiñó con OPD.
Los tres minicerdos fallaron a mostrar título de anticuerpos anti-PPV en los días 0 y 25. Ahora bien, a día

36 (10 días después de la revacunación) se habían desarrollado títulos significativos, aunque bajos (Tabla 6), indicando que la vacuna peptídica es capaz de inducir anticuerpos en cerdos que reconocen el epítopo en viriones purificados de PPV.

TABLA 6

Minicerdo nº	Título día 0	Título día 25	Título día 36
284	28	35	130
283	21	43	226
280	28	31	1194

8.b Análisis por Western Blot

Se efectuó un análisis por Western Blot para analizar la reactividad y especificidad, contra los distintos protómeros del virus, de los sueros procedentes de los tres minicerdos inmunizados.

El procedimiento seguido para chequear la reactividad por Western Blot fue análogo al utilizado en el Ejemplo 7.1, con ligeras modificaciones. El buffer de bloqueo contenía caseína al 1% en vez de suero fetal de ternera y albúmina. Como conjugado se utilizó suero de conejo anti-IgG de cerdo marcada con peroxidasa (Dako P164).

Los resultados indicaron una reacción muy fuerte contra VP1 y VP2 tras las dos inmunizaciones. Estos resultados confirman la gran inmunogenicidad de estos péptidos, lo que confirma su utilidad para la formulación de nuevas vacunas sub-unidad contra PPV.

Ejemplo 9 **FORMULACION DE UNA VACUNA**

Pueden prepararse vacunas capaces de proteger perros, gatos, visones y cerdos de la infección causada por CPV, FPLV, MEV y PPV respectivamente, que contienen uno o más de los péptidos correspondientes proporcionados por esta invención acoplados a una proteína o estructura

multimérica portadora o bien en forma de un complejo inmunogénico o en forma de una proteína recombinante inmunogénica, junto con un diluyente inmunológicamente aceptable tal como una solución salina tamponada a pH fisiológico, más un adyuvante tal como Alhydrogel en combinación con QuilA (25 µg/animal). Una única inyección puede ser suficiente para conferir protección a los animales frente a la enfermedad aunque, en algunos casos, según la evaluación del título de anticuerpos, puede resultar conveniente utilizar una 2ª dosis de recuerdo.

Traducción de las leyendas de las figuras

Figuras 1 y 3

(a) logaritmo del título
(b) días
(c) perro control (3025)
(d) perro vacunado (3029)
(e) perro vacunado (3030)
(f) 1ª inmunización
(g) 2ª inmunización
(h) descarga de virus virulento

Figura 2

(a) logaritmo del título
(b) días
(c) perro 3025, péptido 1L15
(d) perro 3029, péptido 1L15
(e) perro 3030, péptido 1L15
(f) perro 3025, péptido 7L15
(g) perro 3029, péptido 7L15
(h) perro 3030, péptido 7L15
(i) 1ª inmunización
(j) 2ª inmunización
(k) descarga de virus virulento

Figura 4

(a) Absorbancia x 1000 (450 nm)

(b) días
(c) perro control (3025)
(d) perro vacunado (3029)
(e) perro vacunado (3030)
(f) 1ª inmunización
(g) 2ª inmunización
(h) descarga de virus virulento

LISTADO DE SECUENCIAS

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA IDENTIFICADA Nº: 1:

i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 25 Aminoácidos

TIPO: Aminoácidos

TOPOLOGIA: Lineal

ii) TIPO DE LA MOLECULA: Péptido

v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

vi) FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: Parvovirus canino (CPV)

CEPA: Tipo 2

xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 1

Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg
1 5 10 15

Asn Glu Arg Ala Thr Gly Ser Gly Asn
20 25

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA IDENTIFICADA Nº: 2

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 25 Aminoácidos

TIPO: Aminoácidos

TOPOLOGIA: Lineal

(ii) TIPO DE LA MOLECULA: Péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(vi) FUENTE ORIGINAL:

ORGANISMO: Parvovirus porcino (PPV)

CEPA: NADL-2

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 2

Met Ser Glu Asn Val Glu Gln His Asn Pro Ile Asn Ala Gly Thr Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ala Thr Gly Asn Glu Ser Gly
20 25

REIVINDICACIONES

1. Péptidos sintéticos, inmunogénicos, útiles para formular vacunas sintéticas contra parvovirus autónomos.

2. Péptidos según la reivindicación 1 que comprenden los 25 primeros restos de aminoácidos de la región amino terminal de la VP2 de dichos parvovirus autónomos o un fragmento de dicha región.

3. Péptidos según la reivindicación 2, comprendidos en la secuencia SEQ. ID. Nº 1 o equivalentes a los de dicha SEQ. ID. Nº 1 que resulten de la sustitución de unos aminoácidos por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de proteger perros, gatos y visones de la infección causada por CPV, FPLV y MEV, respectivamente.

4. Péptidos según la reivindicación 2, comprendidos en la secuencia SEQ. ID. Nº 2 o equivalentes a los de dicha SEQ. ID. Nº 2 que resulten de la sustitución de unos aminoácidos por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de proteger cerdos de la infección causada por PPV.

5. Una composición inmunogénica que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en forma inmunogénica.

6. Una composición según la reivindicación 5, que

comprende un conjugado inmunogénico de una proteína y un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

7. Una composición según la reivindicación 5, que comprende un complejo inmunogénico formado por entrecruzamiento de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Una composición según la reivindicación 5, que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 obtenido utilizando técnicas de Ingeniería Genética y expresión en microorganismos.

9. Una vacuna que comprende una composición inmunogénica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en combinación con un adyuvante inmunológico.

10. Vacuna sintética capaz de proteger animales de la infección causada por parvovirus autónomos, que comprende:

a) al menos, un péptido sintético contenido dentro de la región amino terminal de la VP2 de dichos parvovirus autónomos, acoplado a una proteína o estructura multimérica portadora adecuada, y

b) un diluyente inmunológicamente aceptable y un adyuvante.

11. Una vacuna según la reivindicación 10 que comprende un péptido comprendido dentro de los 25 primeros restos de aminoácidos de la región amino terminal de la VP2 de dichos parvovirus autónomos.

12. Una vacuna según la reivindicación 10, adecuada para

proteger de la infección causada por un parvovirus autónomo seleccionado del grupo formado por parvovirus canino (CPV), el virus de la enteritis de los visones (MEV), el virus de la panlucopenia felina (FPLV), parvovirus porcino (PPV), parvovirus bovino (BPV), el parvovirus B19 humano u otro parvovirus autónomo.

13. Una vacuna según la reivindicación 10 que comprende, al menos, un péptido comprendido en la secuencia SEQ. ID. Nº 1 o en un fragmento de la misma, o un péptido equivalente a los de dicha SEQ. ID. Nº 1 que resulten de la sustitución de unos aminoácidos por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de proteger perros, gatos y visones de la infección causada por CPV, FPLV y MEV respectivamente.

14. Una vacuna según la reivindicación 10 que comprende, al menos, un péptido comprendido en la secuencia SEQ. ID. Nº 2 o en un fragmento de la misma, o un péptido equivalente a los de dicha SEQ. ID. Nº 2 que resulten de la sustitución de unos aminoácidos por otros funcionalmente equivalentes o de la delección o inserción de algunos de dichos aminoácidos siempre y cuando los péptidos resultantes sean capaces de proteger cerdos de la infección causada por PPV.

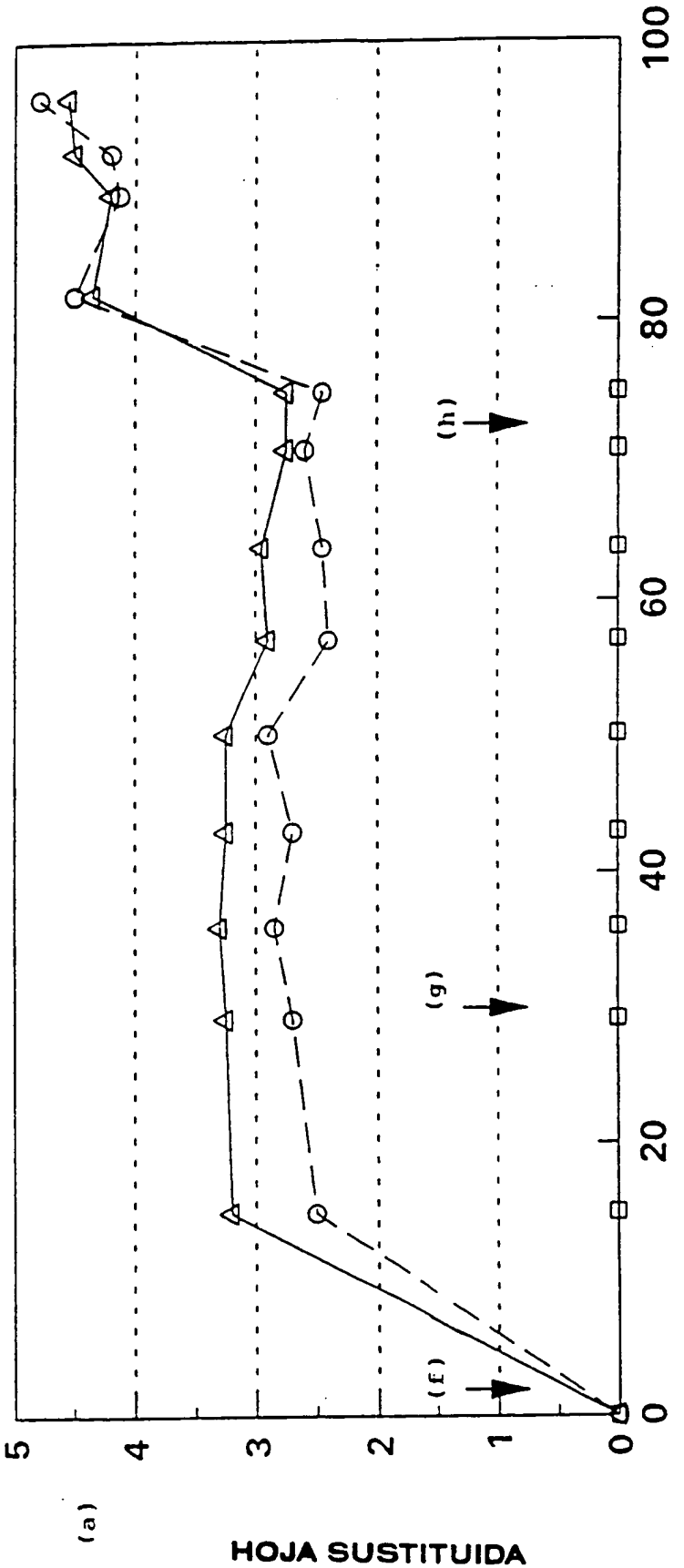


FIGURA 1

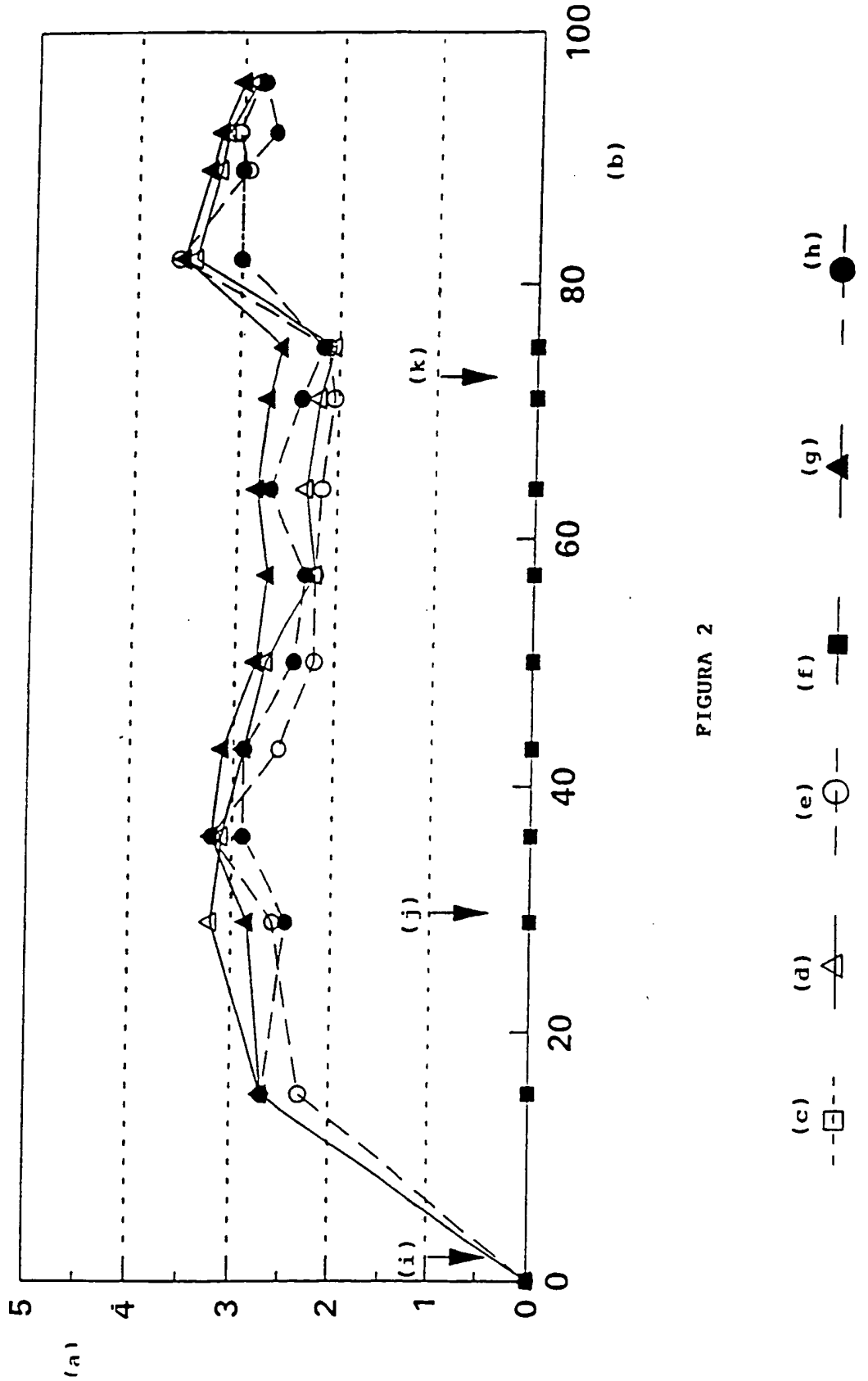


FIGURA 2

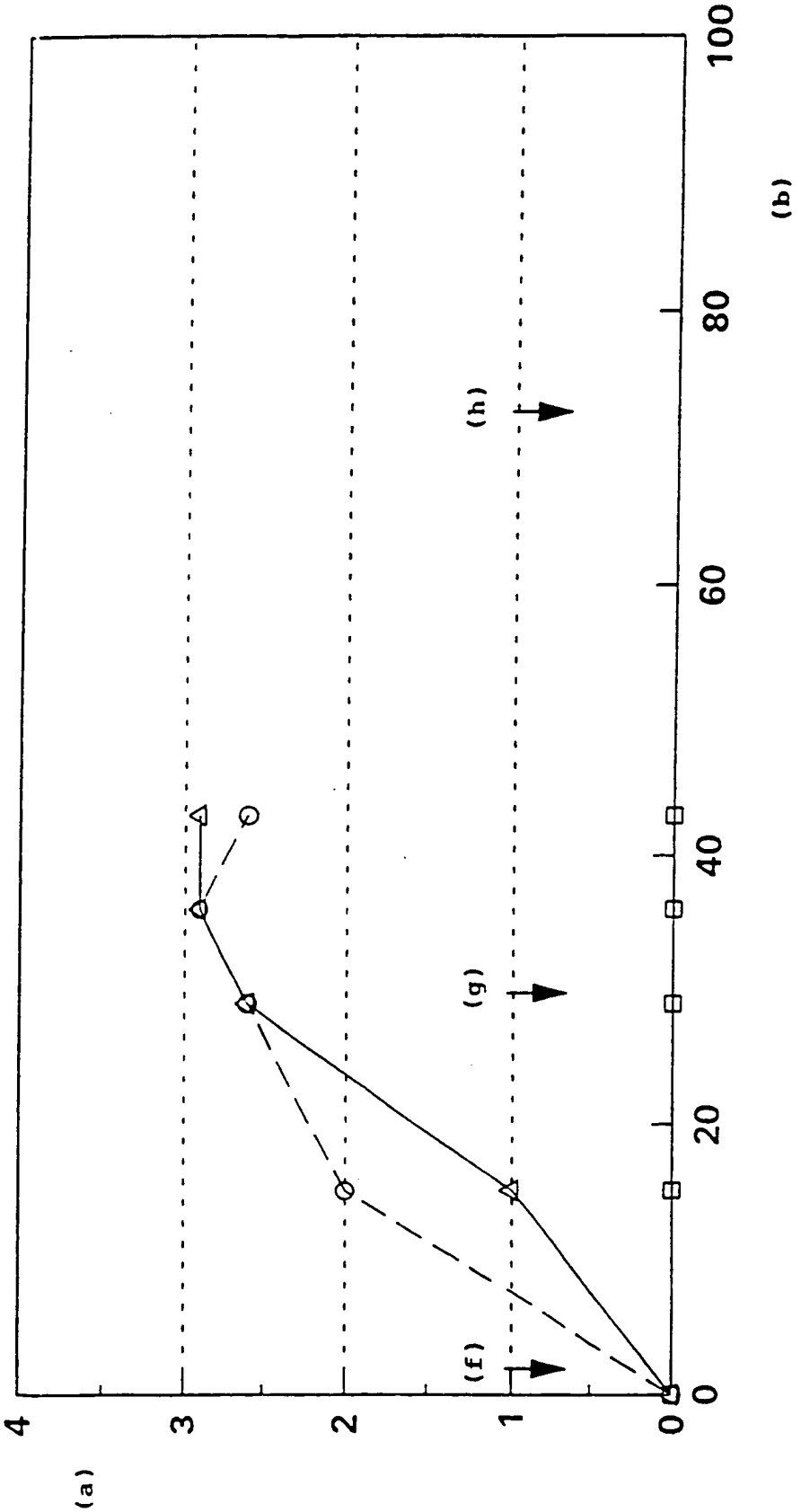


FIGURA 3

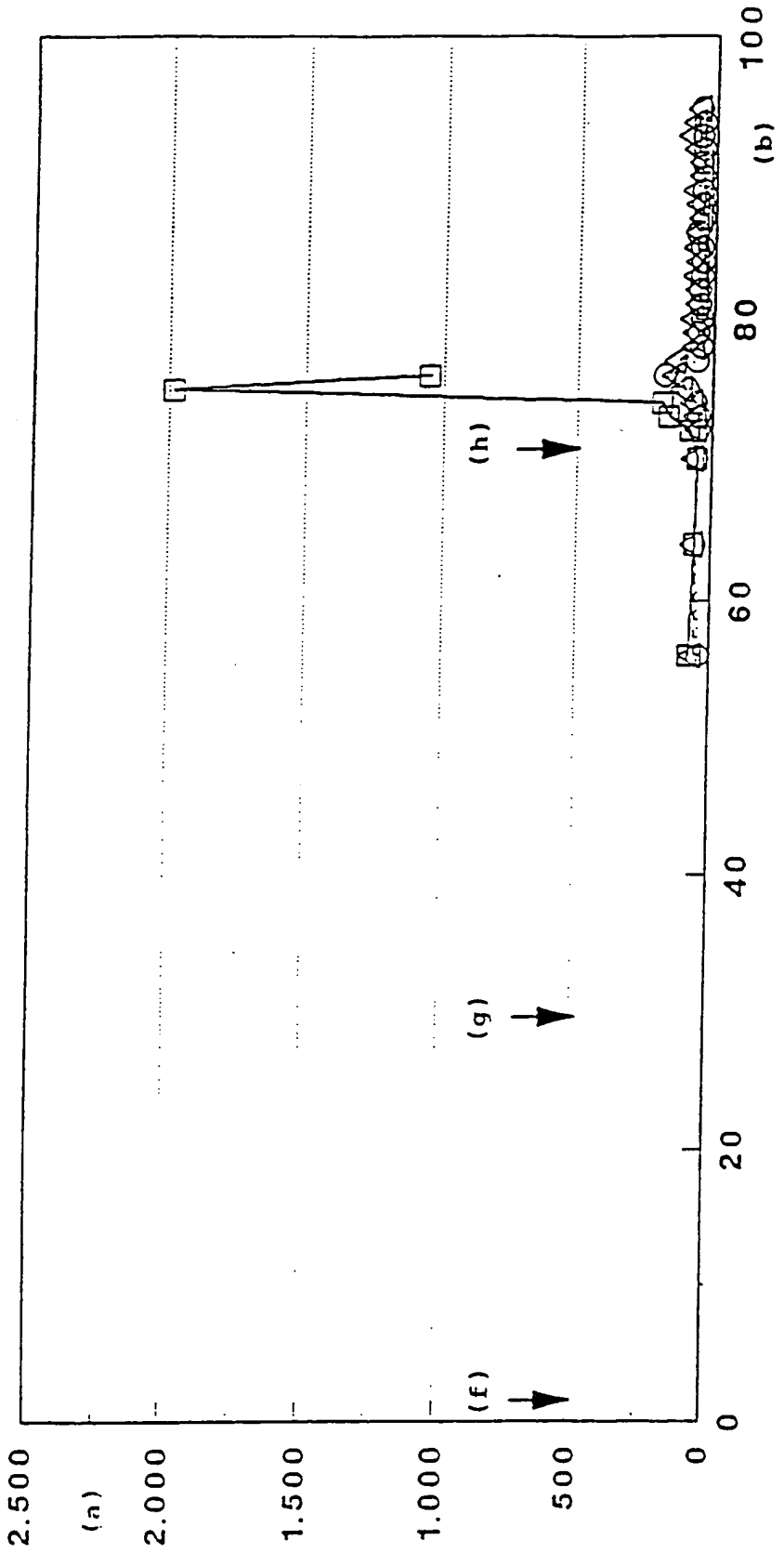


FIGURA 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No
PCT/ES 94/00006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 C07K7/10 A61K39/23

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 June 1994	24. 06. 94

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 72, no. 10 , October 1991 pages 2445 - 2456 JOSÉ A. LÓPEZ DE TURISO ET AL. 'Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes' cited in the application see abstract see page 2445, right column, paragraph 2 - page 2446, left column, paragraph 1 see page 2449, left column, paragraph 2 see page 2449, right column, paragraph 3 - page 2451, left column, paragraph 1 see page 2451, right column, paragraph 2 see page 2452, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 1 see page 2453, right column, last paragraph - page 2454, left column, paragraph 1 see page 2454, left column, last paragraph - right column, paragraph 1 see page 2454, right column, last paragraph - page 2455, left column, paragraph 1	1-3,5, 8-13

X	EP,A,0 117 063 (AMGEN) 29 August 1984 see page 6, line 3 - line 18 see page 7, line 19 - page 8, line 7 see page 8, line 27 - line 36 see page 69, line 5 - page 71, line 5	1,5-9

X	WO,A,91 12269 (MIKROGEN MOLEKULARBIOLOGISCHE ENTWICKLUNGS-GMBH) 22 August 1991 see page 5, paragraph 1 see page 6, paragraph 1 -paragraph 2 see page 8, last paragraph - page 9, paragraph 1	1,5,8,9

X	DE,A,39 39 470 (BIOCHROM BETEILIGUNGS GMBH & CO) 6 June 1991 see page 2, line 5 - line 9 see page 2, line 37 - line 44 see page 2, line 52 - page 3, line 26 see page 3, line 39 - line 40	1,5,8

	-/--	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 67, no. 2 , February 1993 pages 765 - 772 JAN P. LANGEVELD ET AL. 'B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface' cited in the application see abstract see page 765, right column, paragraph 4 - page 766, left column, paragraph 1 see page 766, right column, paragraph 3 - page 767, left column, paragraph 1; table 2 see page 768, right column, paragraph 2 see page 771, left column, paragraph 2	1-3,5,8, 9

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. onal Application No
PCT/ES 94/00006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0117063	29-08-84	JP-T- 60500214	21-02-85
		WO-A- 8402847	02-08-84
WO-A-9112269	22-08-91	DE-A- 4003826	14-08-91
		AU-A- 7211591	03-09-91
		EP-A- 0514413	25-11-92
		JP-T- 5504143	01-07-93
DE-A-3939470	06-06-91	NONE	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Soli. internacional N°
PCT/ES 94/00006

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION
CIP 5 C07K7/10 A61K39/23

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP 5 C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
	-/--	

[X] En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

[X] Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
8 Junio 1994	24. 06. 94
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional: European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado: Montero Lopez, B

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio de 1992)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Sol. Internacional N°
PCT/ES 94/00006

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 72, num. 10 , Octubre 1991 páginas 2445 - 2456 JOSÉ A. LÓPEZ DE TURISO ET AL. 'Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes' citado en la solicitud ver resumen ver página 2445, columna derecha, párrafo 2 - página 2446, columna izquierda, párrafo 1 ver página 2449, columna izquierda, párrafo 2 ver página 2449, columna derecha, párrafo 3 - página 2451, columna izquierda, párrafo 1 ver página 2451, columna derecha, párrafo 2 ver página 2452, columna izquierda, párrafo 2 - columna derecha, párrafo 1 ver página 2453, columna derecha, ultima línea - página 2454, columna izquierda, párrafo 1 ver página 2454, columna izquierda, ultima línea - columna derecha, párrafo 1 ver página 2454, columna derecha, ultima línea - página 2455, columna izquierda, párrafo 1	1-3,5, 8-13

X	EP,A,0 117 063 (AMGEN) 29 Agosto 1984 ver página 6, línea 3 - línea 18 ver página 7, línea 19 - página 8, línea 7 ver página 8, línea 27 - línea 36 ver página 69, línea 5 - página 71, línea 5	1,5-9

X	WO,A,91 12269 (MIKROGEN MOLEKULARBIOLOGISCHE ENTWICKLUNGS-GMBH) 22 Agosto 1991 ver página 5, párrafo 1 ver página 6, párrafo 1 -párrafo 2 ver página 8, ultima línea - página 9, párrafo 1	1,5,8,9

X	DE,A,39 39 470 (BIOCHROM BETEILIGUNGS GMBH & CO) 6 Junio 1991 ver página 2, línea 5 - línea 9 ver página 2, línea 37 - línea 44 ver página 2, línea 52 - página 3, línea 26 ver página 3, línea 39 - línea 40	1,5,8

	-/--	

2

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 67, num. 2 , Febrero 1993 páginas 765 - 772 JAN P. LANGEVELD ET AL. 'B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface' citado en la solicitud ver resumen ver página 765, columna derecha, párrafo 4 - página 766, columna izquierda, párrafo 1 ver página 766, columna derecha, párrafo 3 - página 767, columna izquierda, párrafo 1; tabla 2 ver página 768, columna derecha, párrafo 2 ver página 771, columna izquierda, párrafo 2 -----	1-3,5,8, 9

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Sol. Internacional N°
PCT/ES 94/00006

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP-A-0117063	29-08-84	JP-T-	60500214	21-02-85
		WO-A-	8402847	02-08-84
WO-A-9112269	22-08-91	DE-A-	4003826	14-08-91
		AU-A-	7211591	03-09-91
		EP-A-	0514413	25-11-92
		JP-T-	5504143	01-07-93
DE-A-3939470	06-06-91	NIGUNO		